

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591245

研究課題名（和文）末梢血線維細胞の機能解析による気道リモデリングの評価法の確立

研究課題名（英文）Evaluation of airway remodeling by analyzing functions of peripheral blood fibrocytes.

研究代表者

大嶋 勇成（OHSHIMA YUSEI）

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40303391

研究成果の概要：末梢血単核細胞から線維細胞を誘導するための培養至適切条件を確立し、得られた線維細胞を用いて気道リモデリングに関係する機能の解析を行った。線維細胞はシステイニルロイコトリエンのレセプターを発現しており、ロイコトリエン D4 刺激は増殖には影響しないが、線維芽細胞への分化を抑制し、血管新生に関わる因子の産生を抑制することで、気道炎症に伴う組織修復過程に影響を与える可能性が示唆された。一方、IL-17 刺激では細胞増殖は抑制されるが、CD40L の刺激による IL-6、VEGF 産生を増強し、気道リモデリングを増悪させる可能性が考えられた。また線維細胞は CD4 陽性 T 細胞を活性化し、活性化した T 細胞との CD40/CD40L を介する相互作用により IL-17、IL-6、VEGF 産生増強することで気道リモデリングに関与することが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児免疫・アレルギー・膠原病学

1. 研究開始当初の背景

小児気管支喘息の発症にはアトピー素因に加え、気道過敏性を含めた呼吸機能の異常が関与していると考えられている。成人喘息では呼吸機能の異常に気道リモデリングの関与が指摘されているが、小児気管支喘息の病態における気道リモデリングの役割には不明の点が多い（Payne D, Am J Respir Crit Care Med 2003）。しかし、小児においても喘息発症前の段階で既に気道リモデリ

ングが生じている症例があることから、気道リモデリングの制御を目的としての喘息の早期介入治療の重要性が指摘されている（Djukanovic R, J Allergy Clin Immunol 2002）。

気道リモデリングの進展予防には気道のアレルギー性炎症を抑制することが重要との考えから、わが国や欧米の喘息治療ガイドラインでは吸入ステロイドによる早期治療が推奨されている。しかしながら、近年、相次

いで発表された吸入ステロイドによる早期介入試験の結果は、吸入ステロイドによっても呼吸機能の低下を完全に防げず、喘息の自然経過そのものを大きくかえることは出来ないことが指摘されている(IFWIN study, Lancet 2006, PAC study, N Engl J Med 2006, PEAK trial, N Engl J Med 2006)。これらの結果は吸入ステロイドではアレルギー性炎症を抑制しきれず、気道リモデリングが進行してしまうためと考えられるが、その一方で、気道組織の構成要素である平滑筋細胞や線維芽細胞自体が持つ固有の性状が喘息患者では正常児と異なっているため気道リモデリングが進行しやすいとも考えられる。

本研究では気道リモデリングで問題となる気道平滑筋の肥大や気道上皮基底膜の肥厚、さらには気道粘膜下の毛細血管増生に関与するとされる筋線維芽細胞に着目し、その前駆細胞であることが明らかにされた末梢血中の線維細胞を用いることで(Schmidt M, J Immunol 2003)、気道リモデリングの機序の解析と、その制御方法の検討を試みるとともに、小児気管支喘息患者の気道で生じている気道リモデリングの状態を間接的に評価する方法として末梢血線維細胞を指標とする方法を検討する。

末梢血単核球中の線維細胞の比率は0.1-0.5%と非常に少ないとされていたが(Chesney J Proc Natl Acad Sci 1997)、末梢血単核球細胞の一部から線維細胞を分化させることが可能であることを示す報告が散見されるようになった。(Abe R J Immunol 2001, Philling D J Leukoc Biol 2006)そこで、末梢血単核細胞から線維細胞を誘導し、喘息における気道炎症組織の修復と過程としてのリモデリングの進行を評価ことに利用できることが期待される。

2. 研究の目的

小児喘息患者に対する早期介入を行うためには、小児喘息患者の大半が乳児期に発症することを考えると、乳児喘息患者を対象として治療的介入を行う必要がある。しかしながら、乳児期に喘鳴を呈する患者は必ずしも喘息患者だけではなく、感染に伴い喘鳴を呈するが年齢とともに喘鳴を呈することが無くなるような一過性の喘鳴患者がかなりの割合で存在する(Martinez, Lancet 2006)。そのため、過剰な治療を避け、小児喘息として気道リモデリングが進展し呼吸機能が障害されていくような狭義の喘息患者を同定することが重要となるが、現時点ではアトピーの家族歴、アトピー性皮膚炎の既往歴、吸入抗原への感作が参考事項としてあげられる程度である(Ohshima Y, Ann Allergy Asthma Immunol 2002)。これらは主にアレ

ルギーの有無を指標としたものであり、気道リモデリングに関連した指標がないのが現状である。そこで、本研究では、末梢血単核球から誘導した線維細胞の性状を解析し、喘息発症に関連する線維細胞の特性を明らかにし、その解析方法を確立することで乳児喘息患者の診断と病態評価に応用するための基礎的検討を行なった。

3. 研究の方法

末梢血線維細胞の分離培養は、Chesney ら(Proc Natl Acad Sci USA 1997)やYang ら(Lab Invest 2002)の方法を参考にして行った。末梢血単核球を分離し、フィブロネクチンをコートしたプレート上で培養、4日目に非付着細胞を除去した上でPDGF-BB、VEGFなどの各種増殖因子を添加し21日目に付着細胞として線維細胞を回収した。回収した細胞のCD14、CD1a、CD83、vonWillbrand factor VIIIの発現をフローサイトメーターで測定し、マクロファージ、樹状細胞、血管内皮細胞前駆細胞の混入割合を測定し、線維細胞の純度を評価することで高純度の線維細胞が誘導される条件を検討した。

次に、分離誘導した線維細胞をフィブロネクチンをコートしたプレート上で培養し、気管支喘息の病態、とりわけ気道リモデリングに影響するとされる各種サイトカイン、ロイコトリエンを添加し細胞増殖反応やサイトカイン産生能、コラーゲン産生能を測定した。また、気道炎症において局所に浸潤する活性化CD4陽性T細胞が発現するCD40Lから線維細胞が受ける刺激の効果を再現するため可溶性CD40Lを用いて刺激し、サイトカイン産生能などを検討した。また一部の実験では線維細胞をあらかじめ病原体成分であるPGN、poly I:C、LPSで刺激した後、CD4陽性T細胞と共培養し、培養上清中のサイトカイン産生を測定した。

4. 研究成果

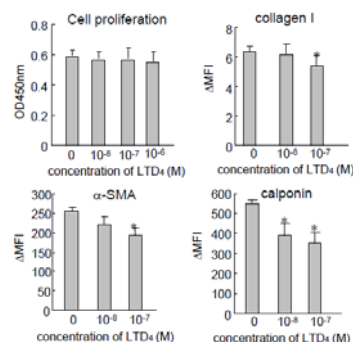
(1) 末梢血単核細胞からの線維細胞誘導法

末梢血単核細胞をフィブロネクチンコート無しのプレートで培養した場合、線維細胞のプレートへの付着性が弱く、回収率、生存率の低下を認めた。また、線維細胞の増殖因子として報告されているVEGFやIL-1 β の添加では線維細胞の回収率が増加するものの、回収した細胞中にそれぞれ血管内皮細胞やマクロファージの形質を持つ細胞の割合が増加することが観察された。一方、PDGF-BBの添加では α -smooth muscle actinを発現した高純度の線維細胞を効率良く回収することが観察された。

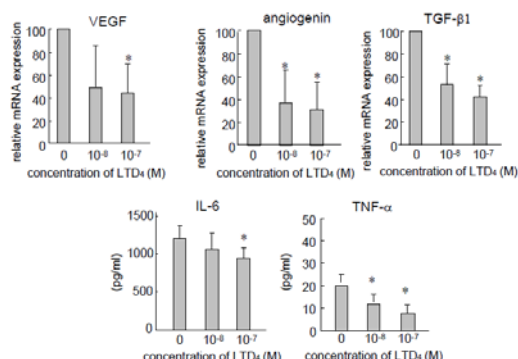
(2) LTD4の線維細胞機能に及ぼす作用

アレルギー性炎症を惹起する重要なメデ

ィエーターの一つであり、気道リモデリングにも関与するシステインロイコトリエンの線維細胞に対する作用を検討するため、線維細胞の CysLT1R, CysLT2R の発現を検討した。その結果、線維細胞は CysLT1R, CysLT2R mRNA を発現し、蛋白レベルでは CysLT2R を主に発現していた。LTD4 の線維細胞の増殖に与える作用は、 $1\mu\text{M}$ までの濃度の範囲では認められなかった。しかし、線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin、Calpain 発現や細胞外基質の collagen I の発現は、LTD4 の濃度に依存して発現が抑制された。



また、気道リモデリングの特徴となる血管新生に関与する VEGF や angiogenin、TGF- β 1 の mRNA の発現 IL-6、TNF- α 産生は、LTD4 の濃度依存性に抑制された。

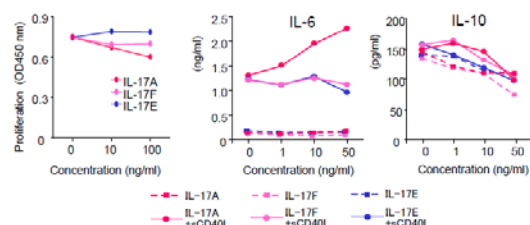


以上の結果より LTD4 は線維細胞に対して、線維芽細胞への分化を抑制し、血管新生に関わる因子の産生を抑制することで、気道炎症に伴う組織修復過程に影響を与える可能性が示唆された。

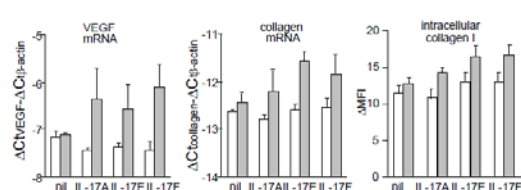
(3) IL-17 ファミリー分子が線維細胞機能におよぼす影響

近年、喘息の病型によっては IL-17 が病態形成に関与していることが報告されている。そこで、IL-17 が線維細胞機能に及ぼす影響を検討したところ、線維細胞の増殖は検討した濃度範囲での IL-17E(IL-25)では影響を受けなかったが、IL-17A または IL-17E の添加では濃度依存性に抑制された。線維細胞による IL-6 産生は IL-17A 刺激では弱いものの

sCD40L 刺激が加わると著明に増加した。また IL-17A 存在下で sCD40L により誘導される IL-6 産生は IL-17A の濃度に依存して著明に増加した。一方 IL-17F, IL-17E は IL-6 産生には影響を与えなかった。線維細胞の IL-10 産生は IL-17A、IL-17E、IL-17F のいずれによっても濃度依存性に抑制された。



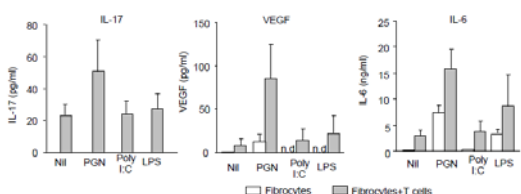
また、線維細胞の VEGF の mRNA 発現は IL-17A、IL-17E、IL-17F 存在下で sCD40L 刺激が加わると増加し、コラーゲン I の発現は IL-17E、IL-17F 存在下で sCD40L 刺激が加わると増加した。



従って、IL-17 を産生し、CD40L を発現する Th17 細胞との相互作用により線維細胞は気道リモデリングの増悪に作用する可能性が考えられた。

(4) 線維細胞が CD4 陽性 T 細胞活性化に及ぼす作用

線維細胞は線維芽細胞の前駆細胞としての性質だけでなく、CD86 や MHC class II も発現し、T 細胞の活性化作用も持つ。一方、乳児喘息では症状誘発に気道感染が関与していることが多い、そこで病原体成分による刺激を受けた線維細胞が T 細胞活性化にどのような影響を与えるかを検討した。



ペプチドグリカンや Poly I:C、LPS により刺激した線維細胞を CD4 陽性 T 細胞と共培養したところ、病原体成分で刺激しない線維細胞でも CD4 陽性 T 細胞と共培養すると IL-17

産生が増強し、ペプチドグリカン刺激が加わると IL-17 産生がさらに増強した。Poly I:C や LPS により刺激した線維細胞と CD4 陽性 T 細胞との共培養では IL-17 産生は認めなかった。

また、線維細胞は CD4 陽性 T 細胞との共培養により、VEGF、IL-6 産生が誘導されるが、PGN 刺激を受けた線維細胞との共培養では VEGF、IL-6 産生は更に増加した。線維細胞と CD4 陽性 T 細胞との共培養による VEGF、IL-6 の産生増強は抗 CD40 抗体の添加により阻害されたことから、活性化 T 細胞の発現する CD40L と線維細胞 CD40 との相互作用が重要な役割を持つと考えられた。

以上の検討結果から、病原体の種類によっては、線維細胞と CD4 陽性 T 細胞との相互作用が増強され、気道リモデリングに関与する因子の産生増強が誘導されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

- ① Yamada A, Ohshima Y, Yasutomi M, Ogura K, Tokuriki S, Naiki H, Mayumi M, Antigen-primed splenic CD8+ T cells impede the development of oral antigen-induced allergic diarrhea, J Allergy Clin Immunol, 123, 888-94, 2009、査読有
- ② 大嶋勇成、小児アレルギー 喘息、湿疹、ポリシーが必要だ、内科、103、577-582、2009、査読無
- ③ Kobata R, Tsukahara H, Ohshima Y, Ohta N, Tokuriki S, Tamura S, Mayumi M, High levels of growth factors in human breast milk, Early Hum Dev, 84, 67-69, 2008、査読有
- ④ Omata N, Ohshima Y, Yamada A, Yasutomi M, Tokuriki S, Mayumi M, A case of milk-protein-induced enterocolitis associated with enterotoxigenic E coli and MRSA infections, Eur J Pediatr, 167, 683-684, 2008、査読有
- ⑤ 足立雄一、村上巧啓、中村利美、谷内江昭宏、大嶋勇成、眞弓光文、外来での簡単な問診票とチェック表を導入することによる喘息ガイドラインに即した治療推進の効果、日本小児アレルギー学会誌、22、369-378、2008、査読有
- ⑥ 大嶋勇成、樹状細胞とアレルギー、アレルギー、57、1265-1269、2008、査読無
- ⑦ 大嶋勇成、アレルギーの発症予防、小児科診療、71、1085-1091、2008、査読無
- ⑧ 大嶋勇成、食物アレルギーのこどもへの対応、小児科臨床、6、11326-1332、2008、査読無
- ⑨ 安富素子、大嶋勇成、眞弓光文、樹状細胞機能からみた自然免疫とアレルギー性炎症の接点、日本小児アレルギー学会誌、22、253-258、2008、査読無

- ⑩ Ohshima Y, Yamada A, Tokuriki S, Yasutomi M, Omata N, Mayumi M, Transmaternal exposure to bisphenol A modulates the development of oral tolerance, Pediatr Res, 62, 60-64, 2007、査読有
- ⑪ Tokuriki S, Ohshima Y, Yamada A, Ohta N, Tsukahara H, Mayumi M, Leukotriene D4 enhances the function of endothelin-1-primed fibroblasts, Clin Immunol, 125, 88-94, 2007、査読有
- ⑫ 大嶋勇成、全身性ステロイド薬の点滴静注により喘息発作増悪を認めた 1 例、Pediatric Allergy for Clinicians, 3, 22-24, 2007、査読無
- ⑬ 大嶋勇成、食物アレルギーの診断 負荷試験の適応、小児内科、39、578-580、2007、査読無
- ⑭ 大嶋勇成、アレルギー性炎症の発症機序、日本小児科学会誌、111、16-22、2007、査読無
- ⑮ 大嶋勇成、気道構成細胞と喘息 樹状細胞、喘息、20、17-21、2007、査読無
- ⑯ 大嶋勇成、小児気管支喘息の急性発作への対応と治療:救急外来・病院での対応、Pediatric Allergy for Clinicians, 3, 19-21、2007、査読無
- ⑰ 大嶋勇成、Roles of dendritic cells in allergic inflammation: A new therapeutic target for bronchial asthma、日本小児アレルギー学会誌、21、345-352、2007、査読無
- ⑱ 大嶋勇成、内因性 Th2 アジュバントとしての TSLP、Allergy From the Nose to the Lung, 5, 13-17、2007、査読無
- ⑲ 大嶋勇成、アレルギー疾患に対する免疫療法の現状と展望、日本小児アレルギー学会誌、21、263-270、2007、査読無

〔学会発表〕(計 16 件)

- ① Yasutomi M, Ohshima Y, Mayumi M Erythromycin inhibits IL-17 production through modulating monocyte-derived dendritic cell function. The 10th International Symposium on Dendritic Cells 2008/10/1-5, Kobe, Japan
- ② 大嶋勇成 教育講演 2 樹状細胞とアレルギー 第 20 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2008/6/12, 14 東京
- ③ 大嶋勇成、安富素子、住本真一、福井徹哉、清益功浩、樋垣泰伸、南部光彦、谷口義弘、眞弓光文 ミニシンポジウム

ム：小児喘息治療の進歩と残された課題：JPGL2005の乳児喘息の診断基準の妥当性と問題点第20回日本アレルギー学会春季臨床大会 2008/6/12, 14 東京

- ④ 大嶋勇成、安富素子 シンポジウム アレルギー病態の分子生物学的解明 感染とアレルギーとの接点における抗原提示細胞の役割 45 回日本小児アレルギー学会 2008/12/13, 14 横浜
- ⑤ 板澤寿子、足立雄一、村上巧啓、中村利美、竹ノ内裕美、津田英夫、大嶋勇成、谷内江昭宏、眞弓光文、宮脇利男 気管支喘息患児保護者における病態の理解度と治療目標に関する調査 45 回日本小児アレルギー学会 2008/12/13, 14 横浜
- ⑥ 安富素子、大嶋勇成、眞弓光文 特別シンポジウム アレルギー疾患と環境因子内分泌攪乱物質とアレルギー疾患 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008/11/28, 29 東京
- ⑦ 大澤陽子、大嶋勇成、藤枝重治 シンポジウム アレルギー疾患の早期診断・早期治療 2 歳未満児のアレルギー性鼻炎の早期診断—いつ発症するのか?— 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008/11/28, 29 東京
- ⑧ 安富素子、金谷由宇子、大嶋勇成、眞弓光文 ミニシンポジウム 抗原提示細胞エリスロマイシンは樹状細胞機能を介してメモリーT細胞のIL-17産生を抑制する 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008/11/28, 29 東京
- ⑨ 山田彰子、大嶋勇成、眞弓光文 ミニシンポジウム 気管支喘息—動物モデル CD8+ T 細胞による即時型食物アレルギー—症状抑制効果の検討 第 58 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2008/11/28, 29 東京
- ⑩ 大嶋勇成、山田彰子、徳力周子、眞弓光文 ミニシンポジウム：小児気管支喘息の治療・管理 ER型救急診療体制での小児喘息患者の発作時対応の問題点と JPGL2005 の影響 第 19 回日本アレルギー学会春季臨床大会号 2007/6/10-12 横浜
- ⑪ 安富素子、金谷由宇子、大嶋勇成、眞弓光文 アウトグロ—後の食物アレルギー児に発症した食物依存性運動誘発アナフィラキシーの1例 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会号 2007/6/10-12 横浜
- ⑫ 大嶋勇成、山田彰子、徳力周子、眞弓光文 ロイコトリエン D4 が線維細胞機能におよぼす抑制効果 第 57 回日本アレルギー学会秋季学術大会 2007/11/1-3 横浜
- ⑬ 山田彰子、大嶋勇成、徳力周子、眞弓光文 CD8+ T 細胞による即時型食物アレルギー—症状抑制効果の検討 第 57 回日本アレ

ルギー学会秋季学術大会 2007/11/1-3 横浜

- ⑭ 足立雄一、村上巧啓、中村利美、谷内昭宏、大嶋勇成、眞弓光文 外来での簡単な問診票を導入することによる喘息ガイドラインに則した治療推進の効果 第 44 回日本小児アレルギー学会 2007/12/8, 9 名古屋
- ⑮ 大嶋勇成 シンポジウム：食物アレルギーの免疫学 動物モデルからの提言 第 44 回日本小児アレルギー学会 2007/12/8, 9 名古屋
- ⑯ 安富素子、大嶋勇成、眞弓光文 ワークショップ：Young allergist の集い 樹状細胞機能からみた自然免疫とアレルギー性炎症との接点 第 44 回日本小児アレルギー学会 2007/12/8, 9 名古屋

〔図書〕(計1件)

- ① 大嶋勇成、眞弓光文 衛生仮説とその検証 呼吸器コモンディズィーズの診療：気管支喘息のすべて p67-71 (2007) 大田健、一ノ瀬正和編 文光堂

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.fukui-med.ac.jp/home/ufms/file/kenkyu/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 勇成 (OHSHIMA YUSEI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40303391

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし